

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

A5

(11)Publication number : 06-007179

(43)Date of publication of application : 18.01.1994

(51)Int.Cl.

C12P 7/42  
 //(C12P 7/42  
   C12R 1:645 )  
   (C12P 7/42  
     C12R 1:72 )  
   (C12P 7/42  
     C12R 1:88 )  
   (C12P 7/42  
     C12R 1:84 )  
   (C12P 7/42  
     C12R 1:78 )  
   (C12P 7/42  
     C12R 1:85 )  
   (C12P 7/42  
     C12R 1:01 )  
   (C12P 7/42  
     C12R 1:13 )  
   (C12P 7/42  
     C12R 1:15 )  
   (C12P 7/42  
     C12R 1:06 )  
   (C12P 7/42  
     C12R 1:265 )  
   (C12P 7/42  
     C12R 1:05 )  
   (C12P 7/42  
     C12R 1:465 )  
   (C12P 7/42  
     C12R 1:365 )

(21)Application number : 04-167404

(71)Applicant : TORAY IND INC

(22)Date of filing : 25.06.1992

(72)Inventor : MIYATA REIKO  
 YONEHARA TORU

## (54) PRODUCTION OF OPTICALLY ACTIVE MANDELIC ACID

### (57)Abstract:

**PURPOSE:** To directly produce the subject compound useful as an optical resolution agent or a raw material for penicillin antibiotics, etc., from benzoylformic acid without using complicate operations by using a specific microorganism and taking advantage of the reducing power of the microorganism.

**CONSTITUTION:** Benzoylformic acid is treated with cultured product, microbial cell, etc., of a microorganism capable of converting benzoylformic acid to optically active mandelic acid and belonging to the genus Apiotrichum, Candida, Torulopsis, Rhodotorula, Trichosporon, Rhodosporidium, Pichia, Klöechera, Hansenula, Saccharomyces, Klebsiella, Rhodococcus, Microbacterium, Brevibacterium, Corynebacterium, Arthrobacter, Enterobacter, Micrococcus, Alcaligenes, Amycolatopsis, Streptomyces or Nocardioideis and the objective compound is separated from the reaction liquid.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 05.04.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3146641

[Date of registration] 12.01.2001

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]



**\* NOTICES \***

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

[Claim(s)]

[Claim 1] It has the capacity to change benzoylformic acid into an optical-activity mandelic acid, and is APIOTORIKAMU (Apiotrichum) Group, Candida (Candida) A group, a torulopsis (Torulopsis) group, Rhodotorula (Rhodotorula) A group, the Trichosporon (Trichosporon) group, The Rhodosporidium (Rhodosporidium) group, the Pichia (Pichia) group, Clo EKKERA (Kloeckera) A group, the Hansenula (Hansenula) d group, The Saccharomyces (Saccharomyces) group, a klebsiella (Klebsiella) group, Rhodococcus (Rhodococcus) A group, a micro barker KUTERIUMU (Microbacterium) group, A BUREBIBATERIUMU (Brevibacterium) group and Corynebacterium (Corynebacterium) Group, The Arthrobacter (Arthrobacter) group, the Enterobacter (Enterobacter) group, Micrococcus (Micrococcus) A group and Alcaligenes (Alcaligenes) Group, Amycolatopsis (Amycolatopsis) The culture of at least a kind of microorganism chosen from the microorganism belonging to a group, a streptomyces (Streptomyces) group and a NOKARU day, or an IDESU (Nocardioides) group, a biomass, or its processing object The manufacture method of the optical-activity mandelic acid characterized by making it act on benzoylformic acid, carrying out generation accumulation of the optical-activity mandelic acid, and carrying out isolation extraction of the optical-activity mandelic acid from reaction mixture.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

### [Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] this invention relates to the manufacture method of an optical-activity mandelic acid.

[0002] Optical-activity mandelic acids are medical raw materials, such as penicillins and a cephalosporin antibiotic, and a still more useful compound as an optical-resolution agent.

[0003]

[Description of the Prior Art] As a method of manufacturing an optical-activity mandelic acid, the optical-resolution method by the fractional crystallization of racemic modification, the optical-resolution method by the chromatography, the organic chemistry synthesizing [ asymmetrically ] method, etc. are learned. Moreover, the method (Japanese Patent Publication No. No. 62393 official report) using a reductase as a method using a microorganism, the method (JP,3-277292,A) using nit RIRAZE, etc. are learned. Moreover, the method (JP,3-57752,B) of using the reducing power of a microorganism is also proposed.

[0004]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, there was a fault, like when based on an optical-resolution method, the synthesizing [ asymmetrically ] method, etc., operation is complicated and optical purity is also low, and the method using a microorganism was not a method satisfying in respect of yield and yield.

[0005]

[Means for Solving the Problem] As a result of considering various the manufacture methods of an optical-activity mandelic acid, this invention persons found out that benzoylformic acid might be drawn in favor of an optical-activity mandelic acid using the reducing power which a microorganism has, and resulted in this invention.

[0006] this invention has the capacity to change benzoylformic acid into an optical-activity mandelic acid.

APIOTORIKAMU (Apiotrichum) A group and Candida (Candida) Group, A torulopsis (Torulopsis) group and Rhodotorula (Rhodotorula) Group, The Trichosporon (Trichosporon) group and Rhodosporidium (Rhodosporidium) Group, The Pichia (Pichia) group and clo EKKERA (Kloeckera) Group, Hansenula (Hansenula) A group and Saccharomyces (Saccharomyces) Group, A klebsiella (Klebsiella) group and Rhodococcus (Rhodococcus) Group, A micro bacterium (Microbacterium) group and Corynebacterium (Corynebacterium) Group, The Brevibacterium (Brevibacterium) group, the Arthrobacter (Arthrobacter) group, The Enterobacter (Enterobacter) group and micro KOKKASU (Micrococcus) Group, Alcaligenes (Alcaligenes) A group and Amycolatopsis (Amycolatopsis) Group, The culture of at least a kind of microorganism chosen from the microorganism belonging to a streptomyces (Streptomyces) group and a NOKARU day, or an IDESU (Nocardioideis) group, It is the manufacture method of the optical-activity mandelic acid characterized by making a biomass or its processing object act on benzoylformic acid, carrying out generation accumulation of the optical-activity mandelic acid, and carrying out isolation extraction of the optical-activity mandelic acid from reaction mixture.

[0007] Hereafter, the composition of this invention is explained in detail.

[0008] In this invention, it has the capacity to change benzoylformic acid into an optical-activity mandelic acid. An APIOTORIKAMU group, the Candida group, a torulopsis group, a Rhodotorula group, A TORIKOPORON group, the Rhodosporidium group, the Pichia group, a clo EKKERA group, The genus Hansenula, Saccharomyces, Klebsiella, a Rhodococcus group, A micro KOKKASU group, the Corynebacterium group, the Arthrobacter group, Brevibacterium, A kind of microorganism chosen from the microorganism belonging to Enterobacter, a MIKUROKOKKASU group, Alcaligenes, the Amycolatopsis group, Streptomyces and a NOKARU day, or an IDESU group is used at least.

[0009] As an example of this microorganism, for example APIOTORIKAMU Humicola ATCC36992, Candida FAMATA IFO0856, Candida PARAPUSHIROSHISU ATCC7330, torulopsis Candida IFO0380, Rhodotorula MINUTA ATCC10658, Trichosporon KUTANEUMU ATCC36993, Rhodosporidium toruloides ATCC10788, Pichia halo FIA ATCC24240, clo EKKERA MAGUNA IFO0868, Hansenula guru KOZAIMA ATCC18938, The Saccharomyces diamond starch dregs IFO1439, klebsiella oxy-talker FERM P10097, the Rhodococcus erythropolis ATCC21035, micro bacterium ammonia FIRAMU ATCC15354, The BUREBI bacterium RAKUTO fur mentum ATCC13869, Corynebacterium guru TAMIKAMU ATCC13032, Arthrobacter SHITOREUMU ATCC11624, Enterobacter aerogenes IFO12010, Micro KOKKASU RUTEUMU IFO12708, Alcaligenes faecalis IAM1473, Amycolatopsis SARUFUYUREA ATCC27624, streptomyces vina SEUSU IFO13425, NOKARUDIO Albers ATCC27980, etc. are mentioned.

[0010] The culture medium which blended suitably the organic and inorganic carbon source in which these bacilli can usually carry out utilization, the nitrogen source and the vitamin, the mineral, etc. is used for cultivation of these microorganisms. pH of a culture medium changes somewhat with biomasses, and is usually desirable in yeast with pH 2-8 and bacteria. [ of pH 3-9 ] What is necessary is for temperature to be usually 20-40 degrees C, and just to usually cultivate a bacillus aerobically or in aversion for four - 20 days.

[0011] In the reaction of this invention, the culture, the biomass, or its processing object of these microorganisms is used. Biomass suspension or a biomass processing object is used preferably. Biomass suspension here is what carried out the centrifugal separation acquisition f the biomass cultivat d and obtain d, and that which ultrasonicated the biomass cultivated and obtained, and the thing fixed in acrylamide g l support etc., for exampl by the well-known method are mentioned with a biomass processing object.

[0012] In the system of reaction of this invention, an energy source is usually added.

[0013] Although it changes as an energy source with strain to be us d, g n rally sugar, such as a glucose, fru tose, sucrose, a glycer l, and a sorbit l, is used.

[0014] The concentration in the inside of the reaction mixture of the benzoylformic acid which is a reaction substrate can usually be used about 0.1 to 5%. About the addition method, either a package or division addition is OK.

[0015] 20-40 degrees C of reaction temperature are usually 2-35 degrees C preferably. pH of reaction mixture — usually — 4.0-8.5 — it is kept desirable at 6.0-8.0 Although reaction time changes with reaction temperature, they are usually 30 degrees C - 90 hours.

[0016] As the reaction method, a substrate is added in cultivation end liquid, there are a method of shaking aerobically and the method of adding sugar to biomass suspension or a biomass processing object as an energy source, adding a substrate next, and shaking aerobically, and although both are employable, a result with latter good one is given.

[0017] In this way, asymmetric reduction of the benzoylformic acid is carried out by the reaction of this invention, and an optical-activity mandelic acid generates it by it.

[0018] What is necessary is just to use the general separation refining method, in order to isolate the optical-activity mandelic acid generated in this way from reaction mixture. For example, after centrifugal separation removes insoluble matter, such as a biomass, from reaction mixture, pH of reaction mixture is adjusted acid, ethyl acetate etc. extracts, and the isolation extraction of the specified substance can be carried out by performing reduced pressure hardening by drying or recrystallization after dehydration.

[0019]

[Example] Hereafter, although an example explains this invention concretely, this invention is not limited only to these examples.

[0020] In addition, the ratio of the amount of generation of a mandelic acid and R bodies, and S bodies was analyzed by the high performance chromatography (HPLC) among the example. The amount analysis of generation uses an ODS column, and the ratio of R bodies and S bodies is the \*\*-ized column SUMIPAK. OA-3000 (Sumitomo Chemical Co., Ltd.) was used.

[0021] Moreover, MA expresses a mandelic acid among an example, yield is expressed with mol % of the generated optical-activity mandelic acid to a reduction substrate, and the rate of the (R) object in the generated mandelic acid is expressed R%.

[0022] Example 1 sucrose 4%, poly peptone 2%, the liquid double ground which consists of 0.5% of yeast extracts and 0.5% of potassium dihydrogenphosphates was set to pH 7.0 in caustic-alkali-of-sodium solution, 5ml was poured distributively in each 18mmphi test tube, and it heat-sterilized for 20 minutes at 120 degrees C among the autoclav . Here, from the slant-face double ground, it inoculated at a time one loop of various kinds of strain shown in Table 1 here, and it was aerobically cultivated on the 48-hour shaker at 28 degrees C. Then, benzoylformic acid was added, and it was made 2ml of total amounts, and shook aerobically at 28 degrees C pH 7.0 for 40 hours so that centrifugal separation separates a biomass, and it may wash at once with water, may adjust a biomass, and this biomass may be added to 18mmphi test tube, glucose might be added so that concentration may become 5% further, and it might become concentration 1wt%.

[0023] Thus, the result which analyzed the obtained reaction mixture by HPLC is shown in Table 1.

[0024]

[Table 1]

表 1

図 株	MA蓄積量 (g/g)	収率 (%)	R (%)
プレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869	1.7	33.1	97.1
クレブシエラ・オキシトカ FERM P-10097	1.5	30.0	95.3
ロドコッカス・エリスロポリス ATCC 21035	4.0	80.5	97.9
コリネバクテリウム・ゲルタミカム ATCC 13032	1.8	36.7	98.9
ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム ATCC 15354	3.0	70.1	95.1
アースロバクター・シトレウム ATCC 11624	4.5	90.1	96.9
エンテロバクター・アエロゲネス IFO 12010	2.9	59.1	87.9
ミクロコッカス・ルテウス ATCC 9341	3.8	76.2	98.1
アルカリゲネス・ファエカリス			

I AM 1473	4.1	82.9	99.0
アミコラトプシス・サルフェレア ATCC 27624	3.9	78.3	95.1
ストレプトマイセス・ピナセウス ATCC 11861	1.4	27.5	99.8
ノカルディオ・アルバス ATCC 27980	2.0	41.1	98.5

[0025] It poured distributively 100ml of the same liquid double grounds as example 2 example 1 at a time to ten 500ml Sakaguchi flasks, and they were heat-sterilized for 20 minutes at 120 degrees C among the autoclave. One loop of Arthrobacter SHITOREUSU ATCC11624 was inoculated here from the slant-face double ground, and it cultivated aerobically by \*\*\*\*\* on a plane at 28 degrees C for 48 hours. Then, benzoylformic acid was added so that a glucose might be added so that centrifugal separation may separate the biomass for 1l. of culture medium, may wash at once with water, it may adjust, this biomass may be added to a 5l. EREN Mayer flask and concentration may become 5% further, and it might twist with concentration 0.5wt%, and it shook aerobically 500ml of total amounts, 80 hours, and pH 7.0. next, centrifugal separation removes a biomass from reaction mixture, after [ pH ] condensing the reaction mixture for 500ml to about 100ml, it adjusts to 2.0, and 100ml of ethyl acetate performs extract operation 3 times, reduced pressure hardening by drying is carried out after dehydration with sulfuric-anhydride magnesium, and it recrystallizes with toluene — this — alike — more — specific rotation [Equation 1]

$$[\alpha]_D^{25} = -142.1^{\circ} \quad (C=1 \text{ EtOH})$$

1.77g of (R)-mandelic acids which \*\*\*\* was obtained.

[0026] Example 3 glucose 5%, the liquid double ground which consists of corn-steep-liquor 5% was set to pH 6.0 in caustic-alkali-of-sodium solution, 5ml was poured distributively in each 18mmphi test tube, and it heat-sterilized for 20 minutes at 120 degrees C among the autoclave. It inoculated at a time one loop of various kinds of strain shown in Table 1 from the slant-face double ground here, and it was aerobically cultivated on the shaker at 28 degrees C for 63 hours. Then, centrifugal separation separated the biomass, it washed at once with water, the biomass was adjusted, this biomass was added to 18mmphi test tube, glyucose was added so that concentration might become 5% further, benzoylformic acid was added so that it might become concentration 1wt%, and it was made 2ml of total amounts, and shook aerobically with pH7.0 at 28 degrees C for 17 hours.

[0027] Thus, the result which analyzed the obtained reaction mixture by HPLC is shown in Table 2.

[0028]

[Table 2]

表 2

菌 株	MA蓄積量 (g/g)	収率 (%)	R (%)
アピオトリカム・フミコーラ ATCC 36992	1.3	26.5	89.3
キャンディダ・ファーマータ IFO 0856	2.3	45.9	91.1
キャンディダ・パラプシロシス ATCC 7330	4.7	95.1	99.5
トルロプシス・キャンディダ IFO 0380	1.8	36.2	90.1
ロドトルラ・ミヌタ ATCC 10658	3.3	66.7	97.5
トリコスボロン・クタネウム ATCC 36993	2.1	41.5	85.1
ロドスポリディウム・トルロイデス ATCC 10788	3.5	70.3	98.0
ピキア・ハロフィア ATCC 24240	3.9	78.1	97.5
クロエッケラ・マグナ IFO 0868	1.7	34.5	90.1
ハンゼヌラ・グルコザイマ ATCC 18938	2.2	44.9	97.5
サッカロマイセス・ダイアスタティカス IFO 1439	1.1	22.1	87.1

[0029] It poured distributively 100ml of the same liquid media as example 4 example 3 at a time to ten Sakaguchi flasks, and they were heat-sterilized for 20 minutes at 120 degrees C among the autoclave. One loop (ATCC7330) of Candida PARAPUSHIROSHISU was inoculated here from the slant-face double ground, and at 28 degrees C, it shook for 63 hours and cultivated aerobically. Then, benzoylformic acid was added so that a glucose might be added so that centrifugal separation may separate the biomass for 1l. of culture medium, may wash at once with water, it may adjust, this biomass may be added to a 5l. EREN Mayer flask and concentration may become 5% further, and it might twist with concentration 1wt%, and it shook aerobically [ in 500ml of total amounts, and 28 degrees C ] 30 hours and pH 7.0. Next, isolation is performed like an example 2 and it is specific rotation. [Equation 2]

$$[\alpha]_D^{25} = -140.1^{\circ} \quad (C=1 \text{ EtOH})$$

1.02g of (R)-mandelic acids which \*\*\*\* was obtained.

[0030]

[Effect of the Invention] It can manufacture advantageously industrially, without according to this invention, being able to acquire an optical-activity mandelic acid from benzoylformic acid directly by the asymmetric reduction reaction using the microorganism, and requiring complicated operation.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-7179

(43)公開日 平成6年(1994)1月18日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 7/42		9282-4B		
// (C 1 2 P 7/42				
C 1 2 R 1:645)				
(C 1 2 P 7/42				
C 1 2 R 1:72)				

審査請求 未請求 請求項の数1(全10頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-167404	(71)出願人	000003159 東レ株式会社 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
(22)出願日	平成4年(1992)6月25日	(72)発明者	宮田 令子 愛知県名古屋市長区大江町9番地の1 東 レ株式会社名古屋事業場内
		(72)発明者	米原 徹 愛知県名古屋市長区大江町9番地の1 東 レ株式会社名古屋事業場内

(54)【発明の名称】 光学活性マンデル酸の製造方法

(57)【要約】

【構成】 ベンゾイルギ酸を光学活性マンデル酸へ変換する能力を有し、アビオトリカム属、キャンディダ属、トルロブシス属、ロドトルラ属、トリコスボロン属、ロドスポリディウム属、ヒキア属、クロエッケラ属、ハンゼヌラ属、サッカロマイセス属、クレブシエラ属、ロドコッカス属、ミクロバクテリウム属、ブレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、アースロバクター属、エンテロバクター属、ミクロコッカス属、アルカリゲネス属、アミコラトブシス属、ストレプトマイセス属およびノカルディオアイデス属に属する微生物より選ばれた少なくとも一種の微生物の培養物、菌体またはその処理物を、ベンゾイルギ酸に作用させて、光学活性マンデル酸を生成蓄積せしめ、反応液から光学活性マンデル酸を単離採取することを特徴とする光学活性マンデル酸の製造方法。

【効果】 ベンゾイルギ酸から光学活性マンデル酸を微生物を用いた不斉還元により直接取得でき、工業的に有利な光学活性マンデル酸の生成が可能となる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ベンゾイルギ酸を光学活性マンデル酸へ変換する能力を有し、アピオトリカム(Apiotrichum) 属、キャンディダ(Candida) 属、トルロブシス(Torulopsis) 属、ロドトルラ(Rhodotorula) 属、トリコスボロン(Trichosporon) 属、ロドスポリディウム(Rhodosporidium) 属、ピキア(Pichia) 属、クロエッケラ(Kloeckera) 属、ハンゼヌラ(Hansenula) 属、サッカロマイセス(Saccharomyces) 属、クレブシエラ(Klebsiella) 属、ロドコッカス(Rhodococcus) 属、ミクロバクテリウム(Microbacterium) 属、ブレビバクテリウム(Brevibacterium) 属、コリネバクテリウム(Corynebacterium) 属、アースロバクター(Arthrobacter) 属、エンテロバクター(Enterobacter) 属、ミクロコッカス(Micrococcus) 属、アルカリゲネス(Alcaligenes) 属、アミコラトプシス(Amycolatopsis) 属、ストレプトマイセス(Streptomyces) 属およびノカルディオアイデス(Nocardioide)s 属に属する微生物より選ばれた少なくとも一種の微生物の培養物、菌体またはその処理物を、ベンゾイルギ酸に作用させて、光学活性マンデル酸を生成蓄積せしめ、反応液から光学活性マンデル酸を単離採取することを特徴とする光学活性マンデル酸の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、光学活性マンデル酸の製造方法に関する。

【0002】 光学活性マンデル酸は、ペニシリン系やセファロースポリン系抗生物質などの医療原料、さらには光学分割剤として有用な化合物である。

## 【0003】

【従来の技術】 光学活性マンデル酸を製造する方法としては、ラセミ体の分別結晶による光学分割法、クロマトグラフィによる光学分割法、有機化学的な不斉合成法などが知られている。また、微生物を用いる方法としては、還元酵素を用いる方法(特公平62393号公報)、ニトリラーゼを用いる方法(特開平3-277292号公報)などが知られている。また、微生物の還元力を利用する方法(特公平3-57752号公報)も提案されている。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、光学分割法や不斉合成法などによる場合は、操作が煩雑で光学純度も低いなどの欠点があり、また微生物を用いる方法は、収率・収量の点で満足がいく方法ではなかった。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、光学活性マンデル酸の製造方法を種々検討した結果、微生物の有する還元力を利用してベンゾイルギ酸を光学活性マンデル酸に有利に導き得ることを見出し、本発明に至った。

【0006】 本発明は、ベンゾイルギ酸を光学活性マン

デル酸へ変換する能力を有し、アピオトリカム(Apiotrichum) 属、キャンディダ(Candida) 属、トルロブシス(Torulopsis) 属、ロドトルラ(Rhodotorula) 属、トリコスボロン(Trichosporon) 属、ロドスポリディウム(Rhodosporidium) 属、ピキア(Pichia) 属、クロエッケラ(Kloeckera) 属、ハンゼヌラ(Hansenula) 属、サッカロマイセス(Saccharomyces) 属、クレブシエラ(Klebsiella) 属、ロドコッカス(Rhodococcus) 属、ミクロバクテリウム(Microbacterium) 属、コリネバクテリウム(Corynebacterium) 属、ブレビバクテリウム(Brevibacterium) 属、アースロバクター(Arthrobacter) 属、エンテロバクター(Enterobacter) 属、ミクロコッカス(Micrococcus) 属、アルカリゲネス(Alcaligenes) 属、アミコラトプシス(Amycolatopsis) 属、ストレプトマイセス(Streptomyces) 属およびノカルディオアイデス(Nocardioide)s 属に属する微生物より選ばれた少なくとも一種の微生物の培養物、菌体またはその処理物を、ベンゾイルギ酸に作用させて、光学活性マンデル酸を生成蓄積せしめ、反応液から光学活性マンデル酸を単離採取することを特徴とする光学活性マンデル酸の製造方法である。

【0007】 以下、本発明の構成を詳細に説明する。

【0008】 本発明においては、ベンゾイルギ酸を光学活性マンデル酸へ変換する能力を有し、アピオトリカム属、キャンディダ属、トルロブシス属、ロドトルラ属、トリコボロン属、ロドスポリディウム属、ピキア属、クロエッケラ属、ハンゼヌラ属、サッカロマイセス属、クレブシエラ属、ロドコッカス属、ミクロコッカス属、コリネバクテリウム属、アースロバクター属、ブレビバクテリウム属、エンテロバクター属、ミクロコッカス属、アルカリゲネス属、アミコラトプシス属、ストレプトマイセス属およびノカルディオアイデス属に属する微生物より選ばれた少なくとも一種の微生物を用いる。

【0009】 かかる微生物の具体例としては、たとえば、アピオトリカム・フミコーラ ATCC 36992、キャンディダ・ファーマータ IFO 0856、キャンディダ・バラブシロシス ATCC 7330、トルロブシス・キャンディダ IFO 0380、ロドトルラ・ミヌタ ATCC 10658、トリコスボロン・クタネウム ATCC 36993、ロドスポリディウム・トルロイデス ATCC 10788、ピキア・ハロフィア ATCC 24240、クロエッケラ・マグナ IFO 0868、ハンゼヌラ・グルコザイマ ATCC 18938、サッカロマイセス・ダイアスタティカス IFO 1439、クレブシエラ・オキシトカ FERM P10097、ロドコッカス・エリスロポリス ATCC 21035、ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム ATCC 15354、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13032、アースロバクター・シトレウム ATCC 11624、エンテロバクター・アエロゲネス IFO 1201

3

0、ミクロコッカス・ルテウムIFO12708、アルカリゲネス・ファエカリスIAM1473、アミコラトブシス・サルフレアATCC27624、ストレプトマイセス・ピナセウスIFO13425、ノカルディオ・アルバスATCC27980などが挙げられる。

【0010】これらの微生物の培養には、通常これらの菌が資化する有機および無機の炭素源、窒素源およびビタミン、ミネラルなどを適宜配合した培地を用いる。培地のpHは、菌体により多少異なり、酵母では通常pH2~8、細菌では通常pH3~9が好ましい。温度は通常20~40℃で、菌は通常4~20日間、好氣的または嫌氣的に培養すればよい。

【0011】本発明の反応においては、これらの微生物の培養物、菌体またはその処理物を用いる。好ましくは菌体懸濁液または菌体処理物を用いる。ここでいう菌体懸濁液とは、培養して得られた菌体を遠心分離取得したもので、菌体処理物とは、培養して得られた菌体を超音波処理したものや、たとえば公知の方法によりアクリルアミドゲル担体などに固定化したものが挙げられる。

【0012】本発明の反応系には、通常エネルギー源を

【0013】エネルギー源としては、使用する菌株により異なるが、一般的にはグルコース、フラクトース、シュクロース、グリセロール、ソルビトールなどの糖質が用いられる。

【0014】反応基質であるベンゾイルギ酸の反応液中での濃度は、通常0.1~5%程度用いることができる。添加方法に関しては、一括あるいは分割添加のどちらでもよい。

【0015】反応温度は、通常20~40℃、好ましくは2~35℃である。反応液のpHは、通常4.0~8.5、好ましくは6.0~8.0に保たれる。反応時間は反応温度によって異なるが、通常30℃~90時間である。

【0016】反応方法としては、培養終了液に基質を添加し、好氣的に振とうする方法と、菌体懸濁液あるいは菌体処理物にエネルギー源として糖質を加え、次に基質を添加し、好氣的に振とうする方法があり、どちらも採用可能であるが後者の方が良好な結果を与える。

4

【0017】かくして、本発明の反応により、ベンゾイルギ酸は不斉還元され光学活性マンデル酸が生成する。

【0018】かくして生成した光学活性マンデル酸を反応液から単離するには、一般的な分離精製方法を用いればよい。たとえば、反応液から遠心分離によって菌体などの不溶性物質を除去したのち、反応液のpHを酸性に調整し、酢酸エチルなどで抽出し、脱水後、減圧乾固あるいは再結晶を行うことにより目的物を単離採取できる。

【0019】

【実施例】以下、実施例によって、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。

【0020】なお、実施例中、マンデル酸の生成量およびR体、S体の比率は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析した。生成量分析はODSカラムを用い、R体、S体の比率は住化カラムSUMIPAK OA-3000(住友化学工業株式会社)を用いた。

【0021】また、実施例中、MAはマンデル酸を表わし、収率は減少基質に対する生成した光学活性マンデル酸のモル%で表わし、R%は生成したマンデル酸中の(R)体の割合を表わす。

【0022】実施例1

シュクロース4%、ポリペプトン2%、酵母エキス0.5%、リン酸二水素カリウム0.5%よりなる液体培地を苛性ソーダ水溶液でpH7.0とし、18mmφ試験管に5mlずつ分注し、オートクレーブ中120℃で、20分間加熱滅菌した。ここに、斜面培地から表1に示す各種の菌株を、1白金耳ずつ接種し、28℃で48時間振とう機上で好氣的に培養した。その後、遠心分離により菌体を分離し、水で一度洗浄して菌体を調整し、18mmφ試験管へこの菌体を添加し、さらに濃度が5%となるようにグリコースを添加し、濃度1wt%となるように、ベンゾイルギ酸を添加し、総量2mlにして28℃で40時間、pH7.0で好氣的に振とうした。

【0023】このようにして得られた反応液をHPLCで分析した結果を表1に示す。

【0024】

【表1】

表 1

菌 株	MA蓄積量 (g/g)	収率 (%)	R (%)
ブレバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC 13869	1.7	33.1	97.1
クレブシエラ・オキシトカ FERM P-10097	1.5	30.0	95.3
ロドコッカス・エリスロポリス ATCC 21035	4.0	80.5	97.9
コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13032	1.8	36.7	98.9
ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム ATCC 15354	3.0	70.1	95.1
アースロバクター・シトレウム ATCC 11624	4.5	90.1	96.9
エンテロバクター・アエロゲネス IFO 12010	2.9	59.1	87.9
ミクロコッカス・ルテウス ATCC 9341	3.8	76.2	98.1
アルカリゲネス・ファエカリス IAM 1473	4.1	82.9	99.0
アミコラトプシス・サルフェレア ATCC 27624	3.9	78.3	95.1
ストレプトマイセス・ピナセウス ATCC 11861	1.4	27.5	99.8
ノカルディオ・アルバス ATCC 27980	2.0	41.1	98.5

## 【0025】実施例2

実施例1と同様の液体培地を、500mlの坂口フラスコ10本へ100mlずつ分注し、オートクレーブ中120℃で、20分間加熱滅菌した。ここに斜面培地からアースロバクター・シトレウスATCC11624を1白金耳接種し、28℃で48時間振とう機上で好気的に培養した。その後、遠心分離により培養液11分の菌体を分離し、水で一度洗浄して調整し、5lのエーレンマイヤーフラスコへこの菌体を添加し、さらに濃度が5%となるようにグルコースを添加し、濃度0.5wt%となるようにベンゾイルギ酸を添加し、総量500ml、80時間、pH7.0で好気的に振とうした。次に、反応液から遠心分離によって菌体を除去し、500ml分の反応液を約100mlに濃縮したのちpHを2.0に調整し、酢

酸エチル100mlで3回抽出操作を行い、無水硫酸マグネシウムで脱水後、減圧乾固し、トルエンで再結晶することにより比旋光度

$$[\alpha]_D^{25} -142.1^{\circ} \quad (C=1 \text{ EtOH})$$

を有する(R)-マンデル酸を1.77g得た。

## 【0026】実施例3

グルコース5%、コーンステープリカー5%からなる液体培地を苛性ソーダ水溶液でpH6.0とし、18mmφ試験管に5mlずつ分注し、オートクレーブ中120℃で20分間加熱滅菌した。ここに斜面培地から表1に示す各種の菌株を、1白金耳ずつ接種し、28℃で63時

間、振とう機上で好氣的に培養した。その後、遠心分離により菌体を分離し、水で一度洗浄して菌体を調整し、18mmφ試験管へこの菌体を添加し、さらに濃度が5%となるようにグリコースを添加し、濃度1wt%となるようにベンゾイルギ酸を添加し、総量2mlにして28℃\*

表 2

\*で17時間pH7.0で好氣的に振とうした。

【0027】このようにして得られた反応液をHPLCで分析した結果を表2に示す。

【0028】

【表2】

菌 株	MA蓄積量 (g/g)	収率 (%)	R (%)
アビオトリカム・フミコーラ ATCC 36992	1.3	26.5	89.3
キャンディダ・ファーマータ IFO 0856	2.3	45.9	91.1
キャンディダ・パラブシロシス ATCC 7330	4.7	95.1	99.5
トルロブシス・キャンディダ IFO 0380	1.8	36.2	90.1
ロドトルラ・ミヌタ ATCC 10658	3.3	66.7	97.5
トリコスボロン・クタネウム ATCC 36993	2.1	41.5	85.1
ロドスポリディウム・トルロイデス ATCC 10788	3.5	70.3	98.0
ビキア・ハロフィア ATCC 24240	3.9	78.1	97.5
クロエッケラ・マグナ IFO 0868	1.7	34.5	90.1
ハンゼヌラ・グルコザイマ ATCC 18938	2.2	44.9	97.5
サッカロマイセス・ダイアスタティカス IFO 1439	1.1	22.1	87.1

#### 【0029】実施例4

実施例3と同様の液体培地を、坂口フラスコ10本へ100mlずつ分注し、オートクレーブ中120℃で20分間加熱滅菌した。ここに斜面培地からキャンディダ・パラブシロシス(ATCC7330)を1白金耳接種し、28℃で63時間振とうし、好氣的に培養した。その後、遠心分離により培養液11分の菌体を分離し、水で一度洗浄して調整し、5lのエーレンマイヤーフラスコへこの菌体を添加し、さらに濃度が5%となるようにグリコースを添加し、濃度1wt%となるようにベンゾイルギ酸を添加し、総量500ml、28℃で30時間、p

40 H7.0で好氣的に振とうした。次に、実施例2と同様にして単離を行い、比旋光度

【数2】

$$[\alpha]_D^{25} -140.1^{\circ} \quad (C=1 \text{ EtOH})$$

を有する(R)-マンデル酸を1.02g得た。

【0030】

【発明の効果】本発明によれば、ベンゾイルギ酸から光学活性マンデル酸を、微生物を用いた不斉還元反応によって直接に取得でき、煩雑な操作を要することなく、工

業的に有利に製造することができる。

【手続補正書】

【提出日】平成5年3月25日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】光学活性マンデル酸の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】ベンゾイルギ酸を光学活性マンデル酸へ変換する能力を有し、アピオトリカム(Apiotrichum)属、キャンディダ(Candida)属、トルロブシス(Torulopsis)属、ロドトルラ(Rhodotorula)属、トリコスポロン(Trichosporon)属、ロドスポリディウム(Rhodosporidium)属、ピキア(Pichia)属、クロエッケラ(Kloeckera)属、ハンゼヌラ(Hansenula)属、サッカロマイセス(Saccharomyces)属、クレブシエラ(Klebsiella)属、ロドコッカス(Rhodococcus)属、ミクロバクテリウム(Microbacterium)属、ブレビバクテリウム(Brevibacterium)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属、アースロバクター(Arthrobacter)属、エンテロバクター(Enterobacter)属、ミクロコッカス(Micrococcus)属、アルカリゲネス(Alcaligenes)属、アミコラトブシス(Amycolatopsis)属、ストレプトマイセス(Streptomyces)属およびノカルディオアイデス(Nocardioideis)属に属する微生物より選ばれた少なくとも一種の微生物の培養物、菌体またはその処理物を、ベンゾイルギ酸に作用させて、光学活性マンデル酸を生成蓄積せしめ、反応液から光学活性マンデル酸を単離採取することを特徴とする光学活性マンデル酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、光学活性マンデル酸の製造方法に関する。

【0002】光学活性マンデル酸は、ペニシリン系やセファロースポリン系抗生物質などの医薬原料、さらには光学分割剤として有用な化合物である。

【0003】

【従来の技術】光学活性マンデル酸を製造する方法としては、ラセミ体の分別結晶による光学分割法、クロマトグラフィによる光学分割法、有機化学的な不斉合成法などが知られている。また、微生物を用いる方法としては、還元酵素を用いる方法(特公平3-62393号公報)、ニトリラーゼを用いる方法(特開平3-277292号公報)などが知られている。また、微生物の還元力を利用する方法(特公平3-57752号公報)も提

案されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、光学分割法や不斉合成法などによる場合は、操作が煩雑で光学純度も低いなどの欠点があり、また微生物を用いる方法は、収率・収量の点で満足がいく方法ではなかった。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、光学活性マンデル酸の製造方法を種々検討した結果、微生物の有する還元力を利用してベンゾイルギ酸を光学活性マンデル酸へ変換する能力を有し、アピオトリカム(Apiotrichum)属、キャンディダ(Candida)属、トルロブシス(Torulopsis)属、ロドトルラ(Rhodotorula)属、トリコスポロン(Trichosporon)属、ロドスポリディウム(Rhodosporidium)属、ピキア(Pichia)属、クロエッケラ(Kloeckera)属、ハンゼヌラ(Hansenula)属、サッカロマイセス(Saccharomyces)属、クレブシエラ(Klebsiella)属、ロドコッカス(Rhodococcus)属、ミクロバクテリウム(Microbacterium)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属、アースロバクター(Arthrobacter)属、エンテロバクター(Enterobacter)属、ミクロコッカス(Micrococcus)属、アルカリゲネス(Alcaligenes)属、アミコラトブシス(Amycolatopsis)属、ストレプトマイセス(Streptomyces)属およびノカルディオアイデス(Nocardioideis)属に属する微生物より選ばれた少なくとも一種の微生物の培養物、菌体またはその処理物を、ベンゾイルギ酸に作用させて、光学活性マンデル酸を生成蓄積せしめ、反応液から光学活性マンデル酸を単離採取することを特徴とする光学活性マンデル酸の製造方法である。

【0007】以下、本発明の構成を詳細に説明する。

【0008】本発明においては、ベンゾイルギ酸を光学活性マンデル酸へ変換する能力を有し、アピオトリカム属、キャンディダ属、トルロブシス属、ロドトルラ属、トリコスポロン属、ロドスポリディウム属、ピキア属、クロエッケラ属、ハンゼヌラ属、サッカロマイセス属、クレブシエラ属、ロドコッカス属、ミクロコッカス属、コリネバクテリウム属、アースロバクター属、ブレビバクテリウム属、エンテロバクター属、ミクロコッカス属、アルカリゲネス属、アミコラトブシス属、ストレプトマイセス属およびノカルディオアイデス属に属する微生物より選ばれた少なくとも一種の微生物を用いる。

【0009】かかる微生物の具体例としては、たとえば、アピオトリカム・フミコーラATCC36992、

キャンディダ・ファーマータIFO0856、キャンディダ・バラブシロシスATCC7330、トルロブシス・キャンディダIFO0380、ロドトルラ・ミヌタATCC10658、トリコスボロン・クタネウムATCC36993、ロドスポリディウム・トルロイデスATCC10788、ピキア・ハロフィアATCC24240、クロエッケラ・マグナIFO0868、ハンゼメラ・グルコザイマATCC18938、サッカロマイセス・ダイアスタチカスIFO1439、クレブシエラ・オキシトカFERM P10097、ロドコッカス・エリスロポリスATCC21035、ミクロバクテリウム・アンモニアフィラムATCC15354、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032、アースロバクター・シトレウムATCC11624、エンテロバクター・アエロゲネスIFO12010、ミクロコッカス・ルテウムIFO12708、アルカリゲネス・ファエカリスIAM1473、アミコラトブシス・サルフェレアATCC27624、ストレプトマイセス・ピナセウスIFO13425、ノカルディオ・アルバスATCC27980などが挙げられる。

【0010】これらの微生物の培養には、通常これらの菌が資化する有機および無機の炭素源、窒素源およびビタミン、ミネラルなどを適宜配合した培地を用いる。培地のpHは、菌体により多少異なり、酵母では通常pH2～8、細菌では通常pH3～9が好ましい。温度は通常20～40℃で、菌は通常4～20日間、好氣的または嫌氣的に培養すればよい。

【0011】本発明の反応においては、これらの微生物の培養物、菌体またはその処理物を用いる。好ましくは菌体懸濁液または菌体処理物を用いる。ここでいう菌体懸濁液とは、培養して得られた菌体を遠心分離取得したもので、菌体処理物とは、培養して得られた菌体を超音波処理したものや、たとえば公知の方法によりアクリルアミドゲル担体などに固定化したものが挙げられる。

【0012】本発明の反応系には、通常エネルギー源を添加する。

【0013】エネルギー源としては、使用する菌株により異なるが、一般的にはグルコース、フラクトース、シュークロース、グリセロール、ソルビトールなどの糖質が用いられる。

【0014】反応基質であるベンゾイルギ酸の反応液中での濃度は、通常0.1～5%程度用いることができる。添加方法に関しては、一括あるいは分割添加のどちらでもよい。

【0015】反応温度は、通常20～40℃、好ましくは2～35℃である。反応液のpHは、通常4.0～8.5、好ましくは6.0～8.0に保たれる。反応時

間は反応温度によって異なるが、通常30℃で30～90時間である。

【0016】反応方法としては、培養終了液に基質を添加し、好氣的に振とうする方法と、菌体懸濁液あるいは菌体処理物にエネルギー源として糖質を加え、次に基質を添加し、好氣的に振とうする方法があり、どちらも採用可能であるが後者の方が良好な結果を与える。

【0017】かくして、本発明の反応により、ベンゾイルギ酸は不斉還元され光学活性マンデル酸が生成する。

【0018】かくして生成した光学活性マンデル酸を反応液から単離するには、一般的な分離精製方法を用いればよい。たとえば、反応液から遠心分離によって菌体などの不溶性物質を除去したのち、反応液のpHを酸性に調整し、酢酸エチルなどで抽出し、脱水後、減圧乾固あるいは再結晶を行うことにより目的物を単離採取できる。

【0019】

【実施例】以下、実施例によって、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。

【0020】なお、実施例中、マンデル酸の生成量およびR体、S体の比率は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析した。生成量分析はODSカラムを用い、R体、S体の比率は住化カラムSUMIPAK OA-3000(住友化学工業株式会社)を用いた。

【0021】また、実施例中、MAはマンデル酸を表わし、収率は減少基質に対する生成した光学活性マンデル酸のモル%で表わし、R%は生成したマンデル酸中の(R)体の割合を表わす。

【0022】実施例1

シュークロース4%、ポリペプトン2%、酵母エキス0.5%、リン酸二水素カリウム0.5%よりなる液体培地を苛性ソーダ水溶液でpH7.0とし、18mmφ試験管に5mlずつ分注し、オートクレーブ中120℃で、20分間加熱滅菌した。ここに、斜面培地から表1に示す各種の菌株を、1白金耳ずつ接種し、28℃で48時間振とう機上で好氣的に培養した。その後、遠心分離により菌体を分離し、水で一度洗浄して菌体を調整し、18mmφ試験管へこの菌体を添加し、さらに濃度が5%となるようにグリコースを添加し、濃度1wt%となるように、ベンゾイルギ酸を添加し、総量2mlにして28℃で40時間、pH7.0で好氣的に振とうした。

【0023】このようにして得られた反応液をHPLCで分析した結果を表1に示す。

【0024】

【表1】

表 1

菌 株	MA蓄積量 (g/g)	収率 (%)	R (%)
プレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869	1.7	33.1	97.1
クレブシエラ・オキシトカ FERM P-10097	1.5	30.0	95.3
ロドコッカス・エリスロポリス ATCC 21035	4.0	80.5	97.9
コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13032	1.8	36.7	98.9
ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム ATCC 15354	3.0	70.1	95.1
アースロバクター・シトレウム ATCC 11624	4.5	90.1	96.9
エンテロバクター・アエロゲネス IFO 12010	2.9	59.1	87.9
ミクロコッカス・ルテウス ATCC 9341	3.8	76.2	98.1
アルカリゲネス・ファエカリス IAM 1473	4.1	82.9	99.0
アミコラトプシス・サルフェレア ATCC 27624	3.9	78.3	95.1
ストレプトマイセス・ピナセウス ATCC 11861	1.4	27.5	99.8
ノカルディオ・アルバス ATCC 27980	2.0	41.1	98.5

## 【0025】実施例2

実施例1と同様の液体培地を、500mlの坂口フラスコ10本へ100mlずつ分注し、オートクレーブ中120℃で、20分間加熱滅菌した。ここに斜面培地からアースロバクター・シトレウスATCC11624を1白金耳接種し、28℃で48時間振とう機上で好氣的に培養した。その後、遠心分離により培養液11分の菌体を分離し、水で一度洗浄して調整し、5lのエーレンマイヤーフラスコへこの菌体を添加し、さらに濃度が5%となるようにグルコースを添加し、濃度0.5wt%となるようにベンゾイルギ酸を添加し、総量500ml、80時間、pH7.0で好氣的に振とうした。次に、反応液から遠心分離によって菌体を除去し、500ml分の反応液を約100mlに濃縮したのちpHを2.0に調整し、酢

酸エチル100mlで3回抽出操作を行い、無水硫酸マグネシウムで脱水後、減圧乾固し、トルエンで再結晶することにより比旋光度

【数1】

$$[\alpha]_D^{25} -142.1^{\circ} \quad (C=1 \text{ EtOH})$$

を有する(R)-マンデル酸を1.77g得た。

## 【0026】実施例3

グルコース5%、コーンステープリカー5%からなる液体培地を苛性ソーダ水溶液でpH6.0とし、18mmφ試験管に5mlずつ分注し、オートクレーブ中120℃で20分間加熱滅菌した。ここに斜面培地から表1に示す

各種の菌株を、1白金耳ずつ接種し、28℃で63時間、振とう機上で好氣的に培養した。その後、遠心分離により菌体を分離し、水で一度洗浄して菌体を調整し、1.8mmφ試験管へこの菌体を添加し、さらに濃度が5%となるようにグリコースを添加し、濃度1wt%となるようにベンゾイルギ酸を添加し、総量2mlにして28℃\*

\*で17時間pH7.0で好氣的に振とうした。

【0027】このようにして得られた反応液をHPLCで分析した結果を表2に示す。

【0028】

【表2】

表 2

菌 株	MA蓄積量 (g/e)	収率 (%)	R (%)
アピオトリカム・フミコーラ ATCC 36992	1.3	26.5	89.3
キャンディダ・ファーマータ IFO 0856	2.3	45.9	91.1
キャンディダ・バラブシロシス ATCC 7330	4.7	95.1	99.5
トルロブシス・キャンディダ IFO 0380	1.8	36.2	90.1
ロドトルラ・ミヌタ ATCC 10658	3.3	66.7	97.5
トリコスボロン・クタネウム ATCC 36993	2.1	41.5	85.1
ロドスポリディウム・トルロイデス ATCC 10788	3.5	70.3	98.0
ビキア・ハロフィア ATCC 24240	3.9	78.1	97.5
クロエッケラ・マグナ IFO 0868	1.7	34.5	90.1
ハンゼヌラ・グルコザイマ ATCC 18938	2.2	44.9	97.5
サッカロマイセス・ダイアスタティカス IFO 1439	1.1	22.1	87.1

#### 【0029】実施例4

実施例3と同様の液体培地を、坂口フラスコ10本へ100mlずつ分注し、オートクレーブ中120℃で20分間加熱滅菌した。ここに斜面培地からキャンディダ・バラブシロシス(ATCC7330)を1白金耳接種し、28℃で63時間振とうし、好氣的に培養した。その後、遠心分離により培養液11分の菌体を分離し、水で一度洗浄して調整し、5.1のエーレンマイヤーフラスコへこの菌体を添加し、さらに濃度が5%となるようにグリコースを添加し、濃度1wt%となるようにベンゾイ

ルギ酸を添加し、総量500ml、28℃で30時間、pH7.0で好氣的に振とうした。次に、実施例2と同様にして単離を行い、比旋光度

【数2】

$$[\alpha]_D^{25} - 140.1^{\circ} \quad (C=1 \text{ EtOH})$$

を有する(R)-マンデル酸を1.02g得た。

【0030】



【発明の効果】本発明によれば、ベンゾイルギ酸から光 \* って直接に取得でき、煩雑な操作を要することなく、工  
学活性マンデル酸を、微生物を用いた不斉還元反応によ\* 業的に有利に製造することができる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>3</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
(C 1 2 P 7/42				
C 1 2 R 1:88)				
(C 1 2 P 7/42				
C 1 2 R 1:84)				
(C 1 2 P 7/42				
C 1 2 R 1:78)				
(C 1 2 P 7/42				
C 1 2 R 1:85)				
(C 1 2 P 7/42				
C 1 2 R 1:01)				
(C 1 2 P 7/42				
C 1 2 R 1:13)				
(C 1 2 P 7/42				
C 1 2 R 1:15)				
(C 1 2 P 7/42				
C 1 2 R 1:06)				
(C 1 2 P 7/42				
C 1 2 R 1:265)				
(C 1 2 P 7/42				
C 1 2 R 1:05)				
(C 1 2 P 7/42				
C 1 2 R 1:465)				
(C 1 2 P 7/42				
C 1 2 R 1:365)				

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第1部門第1区分  
 【発行日】平成11年(1999)11月24日

【公開番号】特開平6-7179  
 【公開日】平成6年(1994)1月18日  
 【年通号数】公開特許公報6-72  
 【出願番号】特願平4-167404  
 【国際特許分類第6版】

C12P 7/42  
 //(C12P 7/42  
 C12R 1:645 )  
 (C12P 7/42  
 C12R 1:72 )  
 (C12P 7/42  
 C12R 1:88 )  
 (C12P 7/42  
 C12R 1:84 )  
 (C12P 7/42  
 C12R 1:78 )  
 (C12P 7/42  
 C12R 1:85 )  
 (C12P 7/42  
 C12R 1:01 )  
 (C12P 7/42  
 C12R 1:13 )  
 (C12P 7/42  
 C12R 1:15 )  
 (C12P 7/42  
 C12R 1:06 )  
 (C12P 7/42  
 C12R 1:265 )  
 (C12P 7/42  
 C12R 1:05 )  
 (C12P 7/42  
 C12R 1:465 )  
 (C12P 7/42  
 C12R 1:365 )  
 【F I】  
 C12P 7/42

【手続補正書】

【提出日】平成11年4月5日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項1

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項1】ベンゾイルギ酸を光学活性マンデル酸へ  
 変換する能力を有し、アピオトリカム(Apiotrichum)

属、キャンディダ(Candida)属、トルロブシス(Torulop-  
 sis)属、ロドトルラ(Rhodotorula)属、トリコスボロン  
 (Trichosporon)属、ロドスポリディウム(Rhodosporidiu-  
 m)属、ピキア(Pichia)属、クロエッケラ(Kloeckera)  
 属、ハンゼヌラ(Hansenula)属、サッカロマイセス(Sacc-  
 haromyces)属、クレブシエラ(Klebsiella)属、ロドコ-  
 ッカス(Rhodococcus)属、ミクロバカクテリウム(Micro-  
 bacterium)属、ブレビバイテリウム(Brevibacterium)

属、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*) 属、アースロバクター(*Arthrobacter*)属、エンテロバクター(*Enterobacter*)属、マイクロコッカス(*Micrococcus*) 属、アルカリゲネス(*Alcaligenes*) 属、アミコラトプシス(*Amycolatopsis*) 属、ストレプトマイセス(*Streptomyces*)属およびノカルディオアイデス(*Nocardioide*s)属に属する微生物

物より選ばれた少なくとも一種の微生物の培養物、菌体またはその処理物を、ベンゾイルギ酸に作用させて、光学活性マンデル酸を生成蓄積せしめ、反応液から光学活性マンデル酸を単離採取することを特徴とする光学活性マンデル酸の製造方法。